

KLU 基因转化亚麻荠的初步研究

高立虎, 蔡永智, 王爱英, 沈海涛, 祝建波*

(石河子大学 生命科学学院 农业生物技术重点实验室, 新疆 石河子 832003)

摘要: 为进一步提高油料作物亚麻荠的含油量, 克隆拟南芥胚珠组织特异型基因的启动子 *pINO* 和拟南芥细胞色素 P450 *KLUH* 基因(*KLU*), 以植物表达载体 pCambia2301 为基础载体, 构建组织特异性启动子 *pINO* 调控 *KLU* 基因的植物表达载体 pCambia2301-*pINO-KLU*, 用根癌农杆菌介导的 floral dip 法转化亚麻荠。结果表明, 农杆菌培养至 OD₆₀₀ 值为 0.8 时, 用等体积渗入培养基(1/2 MS、5%蔗糖、200 μL/L Silwet L-77)重悬菌体转化亚麻荠, 50 mg/L 卡那霉素检测转基因种子的阳性率为 15%, PCR 检测初步证明, *KLU* 基因已整合到部分抗性植株的基因组中, 转化率为 1.8%。

关键词: 亚麻荠; *KLU*; 根癌农杆菌; 滴花法

中图分类号: S565.9 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)10-0025-06

Preliminary Study on Transforming *KLU* into *Camelina sativa* (L.) Crantz

GAO Li-hu, CAI Yong-zhi, WANG Ai-ying, SHEN Hai-tao, ZHU Jian-bo*

(Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: For further improving the oil content of an alternative oil crop species *Camelina sativa* (L.) Crantz, we cloned the *Arabidopsis* ovule organ-specific promoter (*pINO*) and the *Arabidopsis* cytochrome P450 *KLUH* gene (*KLU*). Next, the plant expression vector pCambia2301 was digested and fused *KLU* with *pINO* to construct the plant express vector pCambia 2301-*pINO-KLU*, which was introduced into *Camelina sativa* (L.) Crantz with *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. The results showed that through using the *Agrobacterium* pellet to transform *Camelina sativa* (L.) Crantz, which was resuspended by the same volume of infiltration medium (1/2MS, 5% sucrose, 200 μL/L Silwet L-77) when *Agrobacterium* culture was cultured to OD₆₀₀ = 0.8, positive rate of screening transgenic seeds by Kan (50 mg/L) was 15%. Further PCR analysis confirmed that *KLU* gene had been incorporated into the genome of parts of resistant plant, and the transformation efficiency was 1.8%.

Key words: *Camelina sativa* (L.) Crantz; *KLU*; *Agrobacterium tumefaciens*; floral dip

亚麻荠[*Camelina sativa* (L.) Crantz] 属十字花科 (Cruciferae) 亚麻荠属 (*Camelina*)^[1], 是一种古老的油料作物。亚麻油中的不饱和脂肪酸含量高达 50% 以上。近年来, 随着对亚麻荠产品利用的深入研究, 亚麻荠以其独特的栽培特性、食用价值及工业价值重新引起人们的重视, 在欧美许多国家开始了亚麻荠新一轮的种植及研究热潮^[2]。

为进一步提高亚麻荠 α-亚麻酸的含量,

Büchsen-schütz-Nothdurft 等^[3] 采用甲磺酸乙酯 (ethyl methanesulfonate, EMS) 处理亚麻荠种子, 筛选获得了亚麻酸含量提高的亚麻荠突变体。黄友志等^[4] 用携带有 pBIN19-GUS 重组质粒的农杆菌侵染亚麻荠子叶愈伤组织, 发现侵染后的愈伤组织 GUS 染色为阳性, 但所获得拟转化体 GUS 染色结果却为阴性, 初步说明可以采用农杆菌分导法转化亚麻荠, 但未获得转基因植株。Lu 等^[5] 采用农杆菌介导的真空渗透法 (Vacuum

收稿日期: 2013-04-17

基金项目: 国家转基因专项 (2011ZX005-004); 兵团博士基金项目 (2009jc01)

作者简介: 高立虎 (1986-), 男, 河南新乡人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物基因工程。E-mail: pretiger@163.com

* 通讯作者: 祝建波 (1967-), 男, 新疆石河子人, 研究员, 博士, 主要从事转基因植物研究。E-mail: zjbshz@126.com

infiltration),将携带有 pGDP-FAH12 重组质粒的农杆菌转化亚麻荠,收获了约 1%的转基因种子,并获得单拷贝转基因植株,经检测,转基因植株的脂肪酸含量高于非转基因植株。

植物器官的大小是由遗传调控的,细胞分裂和细胞伸长促使植物器官生长。Anastasiou 等^[6]筛选经化学诱变获得的大量拟南芥突变株,并首次在拟南芥中发现了一种新型胞间信号途径,该途径可以通过控制细胞分裂的时间调控植物器官大小,并首次确定了细胞色素 P450 *KLUH* 基因(*KLU* 基因),其研究表明 *KLU* 基因是植物器官生长的调节因子;*KLU* 基因过量表达可以使拟南芥器官细胞增多、变大,反之,器官变小。Nikolai 等^[7]进一步研究发现,胚珠发育时 *KLU* 基因在珠被中表达,进而调节种子的大小;*KLU* 基因过量表达,能够产生更大的种子,种子含油量也相应提高;相反,该基因缺失,将产生更小的种子,种子含油量降低。

本研究结合亚麻荠的优良农艺学性状和 *KLU* 基因的特性,构建胚珠组织特异性启动子 pINO^[8-9]驱动 *KLU* 基因的植物表达载体,通过农杆菌介导的 floral dip 法(浸花法)^[10]转化亚麻荠,获得转基因植株,以期建立一种简便高效的亚麻荠遗传转化体系,从而为利用现代生物技术改良亚麻荠奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

野生型亚麻荠种子和拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)种子由本实验室提供。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 GV3101 及质粒 pCambia2301 由本实验室保存;Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶购自 Fermentas 公司;T4-DNA Ligase、pGM-T easy vector、琼脂糖凝胶回收

试剂盒、植物 DNA 提取试剂盒、DNA Marker 购自北京 TIANGEN 公司;其他试剂均为国产或进口分析纯试剂。测序工作由华大基因公司完成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 拟南芥和亚麻荠的 DNA 提取采用 CTAB 法^[11]。

1.2.2 植物表达载体 pCambia2301-pINO-KLU 的构建 根据 TAIR 拟南芥基因组数据库(The *Arabidopsis* Information Resource)收录的 *INO* 基因(AT1G23420.1)上游序列和 *KLU* 基因序列(At1g13710.1),设计引物,并引入相应的酶切位点(表 1)。

以拟南芥 DNA 为模板,用引物 KLU_for_和 KLU_rev_BstE II 进行 PCR 扩增,获得 1.8 Kb 目的条带,用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段,并与 pGM-T 载体连接得到 pGM-KLU 载体。用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bst*E II 在 37 °C 条件下分别双酶切 pCambia2301 和 pGM-KLU 载体,回收片段,用 T4 DNA 连接酶 16 °C 下连接过夜,转化大肠杆菌 DH5 α ,挑取单克隆进行培养,提取 PCR 阳性菌液的质粒,经 *Xba* I / *Bst*E II 双酶切鉴定后得到重组质粒 pCambia2301-KLU。

以拟南芥 DNA 为模板,用引物 pINO_for_EcoR I 和 pINO_rev_Xba I 进行 PCR 扩增,获得 2.3 kb 目的条带,琼脂糖凝胶试剂盒回收目的片段,连接 pGM-T 载体得到 pGM-pINO 载体。用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Xba* I 在 37 °C 条件下分别双酶切 pCambia2301-KLU 和 pGM-pINO 载体,回收片段,用 T4 DNA 连接酶 16 °C 下连接过夜,转化大肠杆菌 DH5 α ,挑单克隆培养,提取 PCR 阳性菌液质粒,经 *Eco*R I / *Xba* I 双酶切鉴定后得到植物表达载体 pCambia2301-pINO-KLU。最后通过电转化法将 pCambia2301-pINO-KLU 重组质粒转入农杆菌 GV3101 中,-70 °C 保存备用。

表 1 PCR 扩增的引物序列

基因/启动子名称	引物名称	引物序列(5'-3')	退火温度/°C	大小/bp
pINO	pINO_for_EcoR I	ATAGAATTCGCTTCATTTGGTTCTACGTC	56.5	2 286
	pINO_rev_Xba I	TAATCTAGAAGAGAGTGTGTGTGTACGAT		
KLU	KLU_for_Xba I	TGCTCTAGACACTCTCTCTCTCTGCCATAAC	61.5	1 783
	KLU_rev_BstE II	TGCGGTGACCCCTAACTTCCTTCCCAGCCATAA		

注:引物序列中下划线部分为引入的酶切位点。

1.2.3 亚麻荠的培养 将野生型亚麻荠播种于营养土(腐殖质:蛭石:珍珠岩=4:2:1)中,5 粒/盆(9 cm 直径),置于培养室中培养。培养室温度为 16~20 °C,相对湿度为 60%,光照强度为 4 000 lx,光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗。

1.2.4 Kan(卡那霉素)筛选最适质量浓度的确定 取适量野生型亚麻荠种子,在 70%乙醇中浸泡 30 s,无菌水洗涤 2 次,然后置于 3%次氯酸钠溶液(每 100 mL 含 20 μ L 吐温-20)中振荡洗涤 10 min,最后用无菌水洗涤 3~5 次。将消毒好的种子以 10 粒/皿的密度接种于含

有不同质量浓度(0、15、30、50 mg/L) Kan 的 MS 固体培养基(0.7%琼脂,无蔗糖)中,每种培养基各 4 皿(25 粒/皿)。先将其置于 4 °C 春化培养 2~3 d,而后置于 (22±1) °C、光周期 16 h 光照/8 h 黑暗、光强 4 000 lx 培养室中,10 d 后统计无菌苗生长情况以确定 Kan 筛选的最适质量浓度。

1.2.5 农杆菌介导的 floral dip 转化亚麻荠 待亚麻荠植株的主茎长至 5 cm,且侧枝刚刚呈花芽状的时候去除顶端花序,以促进次级分枝的生长和发育。植株生长至盛花期时准备转化,转化前 2 d 将已形成的果荚剪掉。

取-70 °C 保存的含有 pCambia2301-pINO-KLU 重组质粒的农杆菌 GV3101,在含有 50 mg/L Kan、25 mg/L 庆大霉素 (Gen) 和 100 mg/L 利福平 (Rif) 的 YEB 固体培养基上划线,28 °C 下培养约 36 h。从平板上挑取单菌落接种于 10 mL 含有上述抗生素的 YEB 液体培养基中,28 °C 条件下,180 r/min 振荡培养过夜。吸取 1 mL 农杆菌菌液加入 100 mL 含有上述相应抗生素的 YEB 液体培养基中,28 °C 条件下,180 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 分别为 0.15、0.35、0.80、1.20、1.80、5.000 r/min 离心 15 min,收集菌体,用去离子水配制的渗入培养基(5%蔗糖,200 μL/L Silwet L-77)重新悬浮菌体后转化亚麻荠。转化时用移液器吸取农杆菌重悬渗入培养基滴在亚麻荠花蕾上,确保每一个花蕾都被滴上,之后用保鲜膜把转化过的植株包裹起来以保持湿度,将其避光直立放置于培养室中培养 1 d,而后于正常条件下培养。植株成熟后收取种子记为 T₀ 代种子。采用 Kan 筛选最适质量浓度对收获的 T₀ 代亚麻荠种子进行筛选,统计不同农杆菌菌液浓度^[12] 转化亚麻荠的 T₀ 代种子的阳性率(卡检阳性率)。

渗入培养基作为 floral dip 法转化植物的共培养基培养基,是影响转化效率的一个重要因素,其中包括渗入培养基成分、浓度、pH 值等因素。本研究采用的渗入培养基主要成分为 1/2MS、蔗糖和表面活性剂 Silwet L-77。将含有 pCambia2301-pINO-KLU 重组质粒的农杆菌 GV3101 二次活化至最佳 OD₆₀₀ 值,5 000 r/min 离心 15 min 收集菌体,用不同组合的渗入培养基(A. 1/2MS、5%蔗糖,200 μL/L Silwet L-77, pH=5.7; B. ddH₂O、5%蔗糖,200 μL/L Silwet L-77, pH=5.7; C. 1/2MS、5%蔗糖,200 μL/L Silwet L-77; D. 1/2 MS、200 μL/L Silwet L-77, pH=5.7; E. 1/2 MS、5%蔗糖, pH=5.7)重新悬浮菌体后转化亚麻荠。采用 Kan 筛选最适质量浓度对收获的 T₀ 代亚麻荠种子进行筛选,统计不同渗入培养基转化亚麻荠所得 T₀ 代种子的卡检阳性率。

1.2.6 T₀ 代亚麻荠种子的 Kan 筛选 在确定 Kan

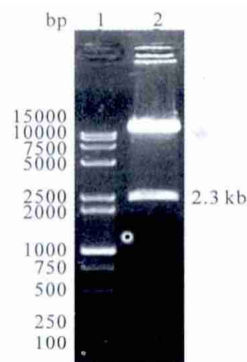
筛选最适质量浓度的基础上,按照 1.2.4 方法对 T₀ 代亚麻荠代种子进行消毒,进行 Kan 筛选。一般情况下,4 d 左右 T₀ 代亚麻荠种子开始萌发,培养约 10 d 后可获得绿色的无菌苗(即抗性苗),而大部分无菌苗白化(白化苗)逐渐死亡,统计不同转化条件下 Kan 检测 T₀ 代亚麻荠种子的阳性率。

1.2.7 抗性苗的 PCR 检测 以提取的抗性苗 DNA 为模板,用引物 KLU_for_Xba I 和 KLU_rev_BstE II 进行 PCR 扩增,然后通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,检测目的基因是否整合到亚麻荠基因组中。

2 结果与分析

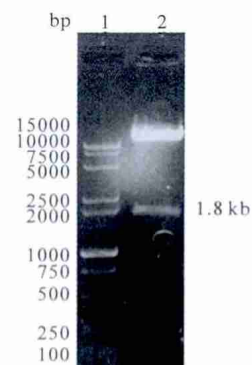
2.1 pCambia2301-pINO-KLU 重组质粒的酶切鉴定及其转化农杆菌 GV3101 的 PCR 鉴定

pCambia2301-pINO-KLU 重组质粒用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切得到 2.3 kb 的 pINO 片段(图 1),用 *Xba* I 和 *BstE* II 双酶切得到 1.8 kb 的 *KLU* 片段(图 2)。提取农杆菌质粒,用引物 KLU_for_Xba I 和 KLU_rev_BstE II 进行 PCR 扩增,获得 1.8 kb 的目的片段(图 3),表明已成功构建 pCambia2301-pINO-KLU 植物表达载体并成功转入农杆菌 GV3101 中。



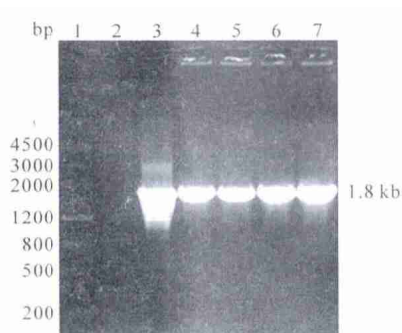
1. DNA Marker; 2. 双酶切(*EcoR* I / *Xba* I) 电泳条带

图 1 pCambia2301-pINO-KLU 重组质粒的酶切 (*EcoR* I / *Xba* I) 鉴定



1. DNA Marker; 2. 双酶切(*Xba* I / *BstE* II) 电泳条带

图 2 pCambia2301-pINO-KLU 重组质粒的酶切 (*Xba* I / *BstE* II) 鉴定



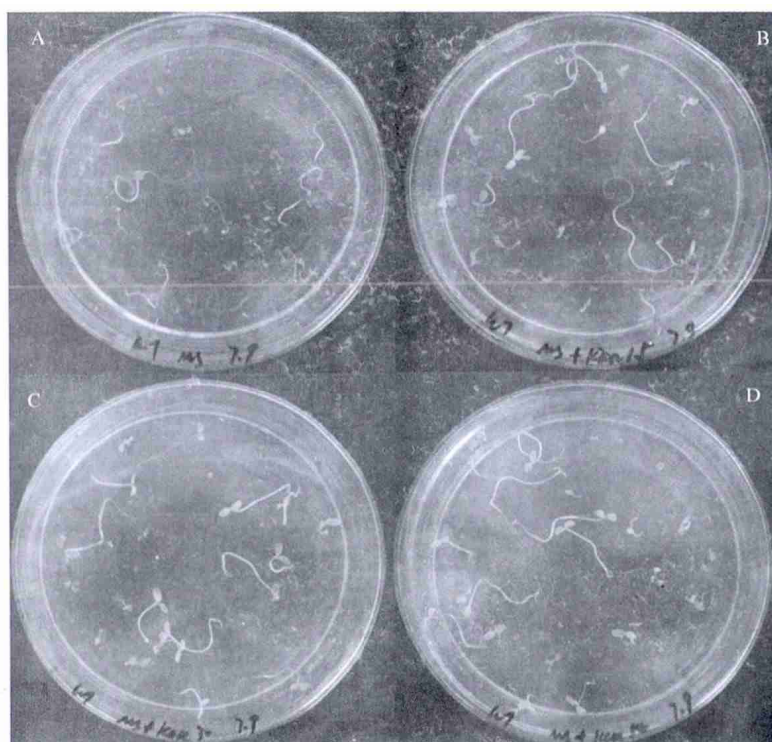
1. DNA Marker; 2. 阴性对照; 3—7. 重组质粒 PCR 结果
图 3 pCAMBIA2301-pINO-KLU 重组质粒转化根癌农杆菌 GV3101 的 PCR 鉴定

2.2 Kan 筛选的最适质量浓度

由表 2 可知,随着 Kan 质量浓度的提高,耐受 Kan 的绿苗数量明显降低,白化苗数量增加,附加 50 mg/L Kan 的培养基中无菌苗全部白化(图 4)。因此,本研究采用 50 mg/L Kan 筛选 T0 代转基因亚麻荠种子。

表 2 不同质量浓度 Kan 对亚麻荠种子萌发及无菌苗生长的影响

Kan 质量浓度/(mg/L)	萌发数/粒	白化苗数/株	绿苗数/株	白化率/%
0	80	0	80	0
15	88	56	32	64
30	88	76	12	86
50	84	84	0	100



A. MS; B. MS+15 mg/L Kan; C. MS+30 mg/L Kan; D. MS+50 mg/L Kan

图 4 不同质量浓度 Kan 对亚麻荠无菌苗生长的影响

2.3 农杆菌介导的 floral dip 法转化亚麻荠的影响因素

2.3.1 农杆菌菌液浓度 从表 3 可以看出,农杆菌菌液浓度(OD_{600} 值)在 0.15~1.80 时,T0 种子卡检

表 3 农杆菌菌液浓度对亚麻荠转化效率的影响

菌液浓度(OD_{600} 值)	卡检阳性率/%
0.15	5
0.35	10
0.80	13
1.20	11
1.80	4

阳性率发生显著变化。二次活化至农杆菌菌液 OD_{600} 值为 0.8 时,卡检阳性率最高为 13%。 OD_{600} 值低于 0.8 时,菌体未进入对数生长期,菌体活力较低致使转

化效率不高; OD_{600} 值高于 0.8 时,菌体老化活力下降,转化效率下降。

2.3.2 渗入培养基成分 图 5 显示,1/2MS、5%蔗糖、200 μ l/L Silwet L-77、pH 值 5.7 这一组合的渗入培养基(A)的卡检阳性率最高;在缺少 1/2MS 作为基本培养基(B)时,卡检阳性率未发生严重下降;pH 值对转化效率无显著影响;在渗入培养基中缺失蔗糖的情况(D)下,卡检阳性率显著降低,仅为 3%;在缺少表面活性剂 Silwet L-77(E)之后,卡检阳性率也显著降低,降至 5%。可见,蔗糖和表面活性剂 Silwet L-77 是农杆菌介导 floral dip 法转化亚麻荠的必要条件,对转化效率有重要影响。

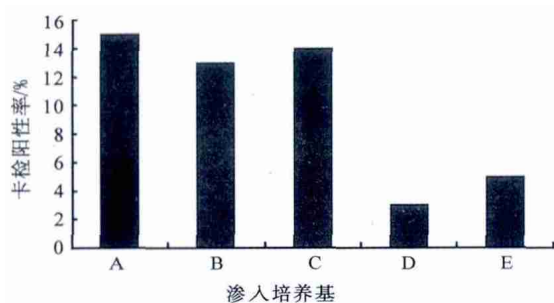
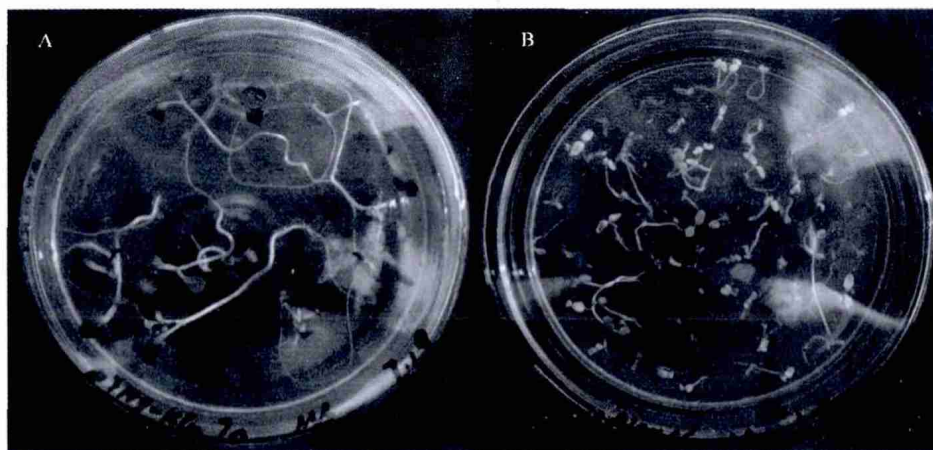


图 5 不同渗入培养基对亚麻荠转化效率的影响

2.4 T₀ 代亚麻荠种子的 Kan 筛选

T₀ 转基因亚麻荠种子消毒后,接种于含有 50 mg/L Kan 的 MS 固体培养基上,培养 10 d 后发现,大部分无菌苗已经白化,但有少量抗性苗存活(图 6)。统计结果显示,floral dip 法转化亚麻荠的卡检阳性率为 15%,即 707 粒 T₀ 代转基因亚麻荠种子经 Kan 筛选共获得 600 株白化苗,107 株抗性苗。

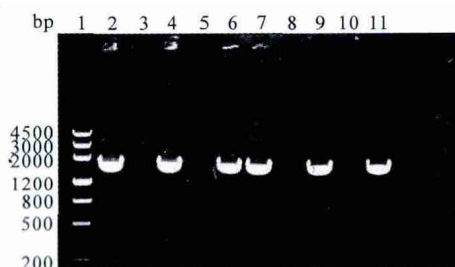


A. MS; B. MS+50 mg/L Kan

图 6 Kan 对 T₀ 代种子无菌苗生长的影响

2.5 亚麻荠抗性苗的 PCR 检测结果

提取经 Kan 筛选获得的拟转基因亚麻荠植株 DNA,进行 PCR 检测,有 13 株抗性苗经 PCR 反应可扩出与阳性对照大小一致的目的条带(图 7),阴性对照即野生型亚麻荠植株未扩出任何条带。结果表明,对 707 粒 T₀ 代亚麻荠种子进行 Kan 筛选,并对 Kan 筛选获得的抗性苗进行 PCR 检测,共获得 13 株转基因亚麻荠植株,故本研究所采用的 floral dip 法转化亚麻荠的效率为 1.8%。



1. DNA marker; 2. 质粒对照;
3. 阴性对照; 4、6、7、9、11. 阳性转基因亚麻荠

图 7 转基因阳性亚麻荠植株的 PCR 鉴定

3 结论与讨论

亚麻荠是近年来被研究者重新重视起来的油料作物,研究发现,亚麻荠具有优良的农艺学特征,如抗旱、抗病虫害、耐盐碱、抗倒伏等,且亚麻荠种子含

有丰富的人体必需的不饱和脂肪酸 α -亚麻酸,其种子油比市场上普通食用油具有更高的食用价值,同时该油作为一种潜在的新型生物燃料,工业价值巨大^[13-16]。目前,国内运用现代生物技术对其进行遗传改良的研究较少,黄友志等^[4]以春性亚麻荠为研究材料,在建立其再生体系的基础上,用含有 *GUS* 基因的根癌农杆菌侵染亚麻荠子叶柄的愈伤组织,发现侵染后的愈伤组织 *GUS* 染色呈假阳性,未获得转基因植株。本研究避开亚麻荠组织培养等繁琐工作,运用农杆菌介导的 floral dip 法侵染亚麻荠成功获得转基因阳性植株,在国内首次建立了一种简便高效的亚麻荠遗传转化体系。

目前农杆菌介导的不依赖组织培养的转化植物方法主要有 3 种:真空渗透法^[17]、浸花法(floral dip)^[10]和喷花法(floral spray)^[18]。真空渗透法需要的仪器设备较多,且在侵染过程中会对植株有所损害;喷花法主要针对植株较大、花序不集中的植物,且在侵染过程中容易造成污染问题。而亚麻荠植株不大,花小且比较集中,采用滴花法最好,且滴花法对植株后续的生长损害较小,短时间之内可以进行多次侵染。李艳等^[19]利用农杆菌介导 floral dip 法转化拟南芥,成功获得 24 个转基因株系。这些方法也被应用于其他经济作物的遗传改良研究中,袁英歌等^[20]运用农杆菌介导的茎尖浸润法、花苞注射法及 floral

spray 法转化棉花品种新陆早 33 号,发现这 3 种方法均获得了抗 Kan 的转化植株,但只在通过花苞注射法和喷花法获得的抗性植株中检测到了目的基因。与 Lu 等^[5]运用的农杆菌介导的真空渗透法相比,本试验采用 floral dip 法,试验操作更加简便、高效,且重复性好,稳定性高。

本试验证明,Silwet L-77 和蔗糖是农杆菌介导的 floral dip 法转化亚麻荠的关键因素。在转化过程中,蔗糖可以维持花粉外压强的稳定,同时为农杆菌进入植物细胞提供能量,另外蔗糖可以诱导 *Vir* 基因表达,提高农杆菌转化效率。表面活性剂 Silwet L-77 具有很强的吸附能力和渗透能力,在其渗透辅助下,T-DNA 从农杆菌顺利进入植物细胞^[21]。本试验结果表明,渗入培养基中缺少 Silwet L-77,亚麻荠的转化效率显著下降。徐光硕等^[22]、王景雪等^[23]研究发现,表面活性剂 Silwet L-77 浓度不宜过高,浓度过高会对植株产生毒害作用,高浓度的 Silwet L-77 会影响甘蓝型油菜荚果伸长,降低结实率。

农杆菌介导的遗传转化过程中,筛选标记是重要的试验因素,本试验采用 Kan 作为筛选标记。试验发现,虽然通过前期亚麻荠对 Kan 质量浓度的敏感试验确定了 Kan 筛选的最适质量浓度,但筛选 T0 代亚麻荠种子获得的抗性苗大部分为假阳性转基因植株,为后续试验增加了工作量。分析其原因:一是亚麻荠对 Kan 浓度敏感试验中所用的亚麻荠种子来源于大田种植的亚麻荠,种子成熟程度不一致,导致试验结果出现误差;二是 Kan 筛选 T0 代亚麻荠种子时发现,种子出芽后,部分无菌苗的根并未扎入培养基中,而是根的一小段附着在培养基表面,使 Kan 无法充分发挥作用,从而导致出现大量假阳性苗。Lu 等^[5]采用红色荧光蛋白基因为筛选标记,通过绿色荧光照射 T0 代种子,肉眼可以轻易分辨出转基因 T0 代种子的真假,工作量较少。因此,在今后的研究中选择更合适、简便的筛选标记是一个重要的研究方向。

参考文献:

- [1] Knorzer K H. Evolution and spread of gold of pleasure (*Camelina sativa* S. L.) [J]. Ber Dtsch Bot Ges, 1978, 91: 187-195.
- [2] Hubbard A. *Camelina sativa* — a pleasurable experience or another false hope [J]. Lipid Technology, 1998, 7: 81-83.
- [3] Büchschütz-Nothdurft A, Schuster A, Friedt W. Breeding for modified fatty acid composition via experimental mutagenesis in *Camelina sativa* (L.) Crtz. [J]. Industrial Crops and Products, 1998, 7(2-3): 291-295.
- [4] 黄友志, 孙宝启, 肖兴国. 油料新作物亚麻荠的初步研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2002.
- [5] Lu Chao-fu, Kang Jin-ling. Generation of transgenic plants of a potential oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-

- mediated transformation [J]. Plant Cell Rep, 2008, 27: 273-278.
- [6] Anastasiou E, Kenz S, Gerstung M, et al. Control of plant organ size by *KLUH/CYP78A5*-dependent intercellular signaling [J]. Dev Cell, 2007, 13: 843-856.
- [7] Nikolai M, Adamski, Elena Anastasiou, et al. Local maternal control of seed size by *KLUH/CYP78A5*-dependent growth signaling [J]. PNAS, 2009, 106: 20115-20120.
- [8] Robert J, Louren M, Charles S, et al. SUPERMAN attenuates positive *INNER NO OUTER* autoregulation to maintain polar development of *Arabidopsis* ovule outer integuments [J]. Development, 2002, 129: 4281-4289.
- [9] Robert J, Meister, Luis A, et al. Definition and interactions of a positive regulatory element of the *Arabidopsis* *INNER NO OUTER* promoter [J]. The Plant Journal, 2004, 37: 426-438.
- [10] Steven J, Clough, Andrew F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 1998, 16 (6): 735-743.
- [11] 张定国, 黄先忠, 东锐, 等. 棉花 *GhFTL1* 基因启动子的克隆及序列分析 [J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2012, 30 (5): 535-539.
- [12] 韩光明, 李三和, 陈志军, 等. 根癌农杆菌介导的高效水稻遗传转化影响因素 [J]. 华北农学报, 2012, 27 (增刊): 46-50.
- [13] Bonjean A, Gofic F L. False flax — *Camelina sativa* (L.) Crantz. : An opportunity for European agriculture and industry [J]. OCL, 1999, 6(1): 28-33.
- [14] Budin J T, Breene W M. Some compositional properties of camelina (*Camelina sativa* L. Crantz.) seeds and oils [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1995, 72: 309-315.
- [15] 吴桂丽, 郝玉珍, 马素峰, 等. 不同亚麻品种萌发期抗旱性研究 [J]. 河南农业科学, 2012, 41(12): 52-55.
- [16] Aurere B, Robin H H, Adrian O. Camelina oil as a fuel for diesel transport engines [J]. Industrial Crops and Products, 2003, 17: 191-197.
- [17] Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants [J]. Compt Rend Acad Sci Paris, 1993, 316: 1194-1199.
- [18] Chung Ming Hsan, Chen Ming Kung, Pan Shu Mei. Floral Spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants [J]. Transgenic Research, 2000, 9(6): 471-476.
- [19] 李艳, 温玮, 彭丽军, 等. 棉花 *GhGAI3a DELLA* 功能域缺失过表达载体的构建及其功能初步分析 [J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2012, 30(5): 540-544.
- [20] 袁英歌, 郭传宇, 高朝宝, 等. 棉花 *DELLA* 基因干扰载体的构建及转化研究 [J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2011, 29(4): 397-400.
- [21] 韦献雅, 付绍红, 牛应泽. 农杆菌介导 floral-dip 转基因方法研究进展 [J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(3): 362-367.
- [22] 徐光硕, 饶勇强, 陈雁, 等. 用 inplant 方法转化甘蓝型油菜 [J]. 作物学报, 2004, 30(1): 1-5.
- [23] 王景雪, 杜建中, 荣二花, 等. 油菜下胚轴农杆菌介导法转化影响因素探讨 [J]. 华北农学报, 2005, 20 (2): 12-15.